



I. DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE ABSORÇÃO PARA NORBIXINA E DOS SAIS DE SÓDIO E POTÁSSIO DA NORBIXINA. II. ESTUDO DE ESTABILIDADE DE NORBIXINA.

Danieli Almeida dos **Santos**¹; Marta Gomes da **Silva**²; Enieluce Santos **Brito**³; Paulo Roberto Nogueira **Carvalho**⁴

Nº 16225

RESUMO – A bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) é o carotenoide predominante nas sementes de urucum (*Bixa orellana* L). Com características peculiares, como a configuração cis e a capacidade de solubilizar em óleo e em soluções aquosas na forma de sal de norbixina (9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-ácido dióico), esses pigmentos tornaram-se os corantes naturais mais utilizados em alimentos no Brasil. Como a maioria dos carotenoides, a bixina e a norbixina são facilmente degradadas por fatores como o oxigênio, a luz e a temperatura. Essa labilidade limita a manutenção de padrões analíticos confiáveis fazendo com que os profissionais dessa área utilizem para a quantificação desses pigmentos os coeficientes de absorção ($E_{1cm}^{1\%}$) publicados em normas técnicas ou artigos científicos. Vários desses artigos científicos e normas técnicas têm apresentado coeficientes de absorção para a norbixina e para os sais de norbixina em alguns solventes, mas, em muitos casos, esses valores são divergentes gerando uma grande insegurança entre os profissionais dessa área. Esse artigo apresenta o resultado de estudos para a avaliação de coeficientes de absorção para a norbixina em diferentes solventes e para os sais de sódio e potássio da norbixina. Este artigo também apresenta os resultados de um estudo de estabilidade de norbixina em três condições de armazenamento (-20°C, 10°C e 25°C).

Palavras-chave: Urucum, Norbixina, Coeficiente de Absorção, Estabilidade.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química, PUC- Campinas-SP; danielialmeida.santos@gmail.com

2 Colaborador, Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP.

3 Colaborador, Assistente de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP.

4 Orientador: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP; carvalho@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT - *The bixin (methyl hydrogen 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioate) is the predominant carotenoid in annatto seeds (Bixa orellana L). With particular characteristics, such as the cis configuration and the capacity to solubilize oil and aqueous solutions as norbixin salt (9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioic acid), these pigments have become more natural dyes used in foods in Brazil. Like most carotenoids, the bixin and norbixin are easily degraded by factors such as oxygen, light and temperature. This lability limits the maintaining of reliable analytical standards causing the use professionals in this area for quantification of these pigments the absorption coefficients published in technical standards or scientific articles. Several of these scientific articles and technical standards have shown absorption coefficients for norbixin and the norbixin salts in some solvents, but in many cases these values are divergent by generating a large uncertainty among professionals in this area. This paper presents the results of studies to evaluate absorption coefficients for norbixin in different solvents and the sodium and potassium salts of norbixin. This article also shows the results of a stability study norbixin at three storage conditions (-20 ° C, 10 ° C and 25 ° C).*

Keywords: Annatto, Norbixin, Absorption Coefficients, Stability.

1 INTRODUÇÃO

O urucum é uma planta da família das bixáceas, nativa na América tropical (JOLY, 2002). Em sua semente o pigmento de maior concentração é a *cis*-bixina, correspondente a aproximadamente 80% dos carotenoides totais do fruto (PRESTON e RICKARD, 1980). Esse fruto é utilizado principalmente na indústria alimentícia, porém está presente em diversos outros setores, como os de cosméticos, cerâmicas, tintas, medicina, indústrias têxteis e farmacêuticas (CARVALHO e HEIN, 1989).

As principais formas de processamento do corante de urucum são extrações dos pigmentos com solução alcalina, óleo vegetal ou solventes orgânicos. Na hidrólise em meio alcalino, a bixina é saponificada ao “sal de norbixina”. O uso de soluções alcalinas, como hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio na extração dos pigmentos é muito estudado, pois é o método de extração mais econômicos e eficiente e o mais utilizado pelas indústrias de corante. O produto final desse tipo de extração é uma solução aquosa alcalina contendo sais de potássio ou de sódio de norbixina (REDDY, 1976).



Suas peculiaridades e a enorme importância dos corantes derivados das sementes de urucum nas indústrias de alimentos têm gerado uma série de trabalhos científicos que têm como base o uso de técnicas analíticas simples como a espectrofotometria no comprimento de onda visível (colorimetria) e que tem sido à base de muitos artigos científicos e, principalmente, o método analítico utilizado no controle de qualidade e no comércio das sementes de urucum.

Um problema é que a norbixina como todos os pigmentos carotenoides é extremamente lábil e a manutenção de padrões analíticos confiáveis é bastante questionável. Por isso o grande artifício tem sido lançar mão do coeficiente de absorção ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$), também conhecido como coeficiente de extinção ou absorbância específica. A importância desses coeficientes de absorção é tanta que prolifera na literatura um grande número desses fatores para os mais diferentes solventes e, em alguns casos, com valores diferentes para um mesmo solvente.

Há uma discussão sobre a validade de alguns dos coeficientes de absorção mais utilizados para a avaliação da norbixina. Esses questionamentos têm sido caracterizados pela ausência de confirmação científica dos valores apresentados.

O objetivo desse estudo foi separar, caracterizar e purificar um padrão de norbixina e determinar o coeficiente de absorção desse carotenoide. O artigo apresenta também o resultado de um estudo de estabilidade desse pigmento em três diferentes temperaturas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

Sementes de urucum da safra de 2014 foram adquiridas de uma empresa da região de Campinas, e armazenadas sob-refrigeração ($T < -5^{\circ}\text{C}$), em embalagens seladas a vácuo. Para a preparação do padrão norbixina foram seguidas as etapas descritas por Rios e Mercadante (2004).

2.2 Obtenção de norbixina

Para o preparo de norbixina foram pesadas 200 g de sementes de urucum em um becker de vidro e adicionado 400 mL de éter de petróleo, para eliminação dos lipídios. O extrato foi agitado e a fase etérea foi descartada. O procedimento foi repetido mais uma vez. Para extração de pigmentos foram adicionados 400 mL de etanol/diclorometano (1:1), agitado e a semente foi separada do solvente. O diclorometano foi evaporado por destilação a vácuo. Após a evaporação o extrato foi transferido para um erlenmeyer e foi adicionado 200 mL de KOH 10% em etanol (p/v). Os pigmentos foram saponificados por uma noite em temperatura ambiente. Os pigmentos foram precipitados com ácido acético glacial e diluídos em acetato de etila com gotas de etanol e éter de



petróleo. Em uma coluna de vidro com diâmetro de cerca de 25 mm com placa porosa e torneira de teflon, foi adicionado cerca de 10 cm de sílica gel 60 e aproximadamente 1 cm de sulfato de sódio anidro. A coluna foi lavada com acetato de etila e uma alíquota dos pigmentos foi adicionada. A eluição foi iniciada com a adição acetato de etila, seguida de acetato de etila:etanol absoluto (1:1) e acetato de etila:metanol (1:1) para a eluição de outros pigmentos. A norbixina foi eluída com metanol. O excesso de metanol foi evaporado e o pigmento resultante foi secado sob fluxo de nitrogênio.

2.3 Avaliação da pureza da norbixina

A norbixina separada foi triturada em um almofariz e uma massa de 30,5 mg foi pesada e diluída em 50 mL de metanol. Para a determinação da concentração, uma alíquota foi seca sob fluxo de nitrogênio e diluída em uma solução de NaOH e KOH 0,5% (m/v). A concentração de norbixina na solução foi determinada em leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 453 nm e 482 nm, utilizando os coeficientes de absorção apresentados por Reith & Gielen (1971) $E_{1cm}^{1\%} = 2850$ (453 nm) e pela FAO (2006) $E_{1cm}^{1\%} = 2870$ (482 nm).

A avaliação da pureza (ausência de outros pigmentos) da norbixina foi analisada por cromatografia de alta eficiência. Para isso foi utilizado um cromatógrafo marca Agilent, modelo Infinity 1260, acoplado a detector de arranjo de diodos. A eluição ocorreu em coluna de fase reversa (C18), de 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, com partículas de 5 μ m (Merck), tendo como fase móvel acetonitrila:ácido acético 2% (65:35, v/v) em sistema isocrático com vazão de 1,0 mL/min e a monitoração a 460 nm.

2.4 Estabelecimento dos coeficientes de absorção

Para o estabelecimento dos coeficientes de absorção foram preparadas curvas com o padrão de norbixina separado nesse estudo, diluído em diferentes solventes. Foram estudados os seguintes solventes: KOH (0,5% m/v), NaOH (0,5% m/v), Acetona, Metanol e Clorofórmio adicionado de ácido acético (1% v/v). Cada curva foi construída com dez pontos em concentrações que apresentassem leituras entre 0 e 1 unidade de absorbância. Para cada solvente foram construídas três curvas em dois comprimentos de ondas, representando os pontos de máxima absorção do espectro da norbixina, identificados como picos II e III na Figura 1. A leitura foi realizada em dois espectrofotômetros de feixe simples, da marca Varian, modelo Cary 50, devidamente calibrados. Portanto cada coeficiente de absorção estabelecido nesse estudo representa o valor médio calculado a partir de seis curvas construídas com dez pontos.

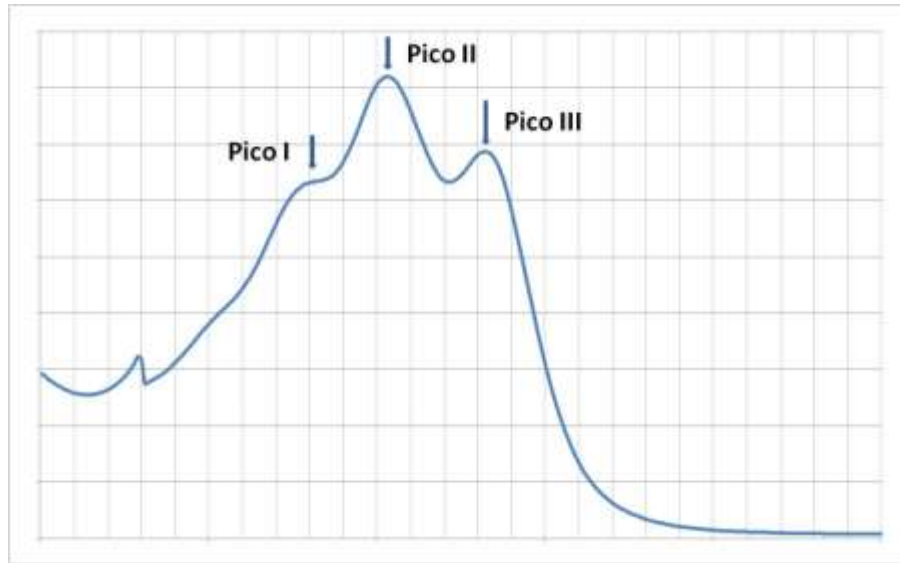


Figura 1. Espectro característico da norbixina com a identificação dos picos I, II e III.

2.5 Estabilidade norbixato

Para a avaliação da estabilidade, amostras de norbixina preparada em laboratório foram envasadas em frascos de vidro de 12 ml, recobertos com papel alumínio para a proteção da luz e com tampa e batoque para evitar a troca de oxigênio com o meio. As amostras foram mantidas em duas câmaras marca Eletrolab, modelo 131FC às temperaturas de $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e em um Freezer vertical marca cònsul de 280L à temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As amostragens foram realizadas nos seguintes períodos: 0 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias. Para as análises foram pesadas aproximadamente 0,03g de norbixina, que foram diluídas com KOH 0,5% até que os valores de absorbância ficassem entre 0,3 e 0,7. A quantificação foi realizada a 453 nm com o uso de um coeficiente de absorção de 2850 (REITH & GIELEN, 1971).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

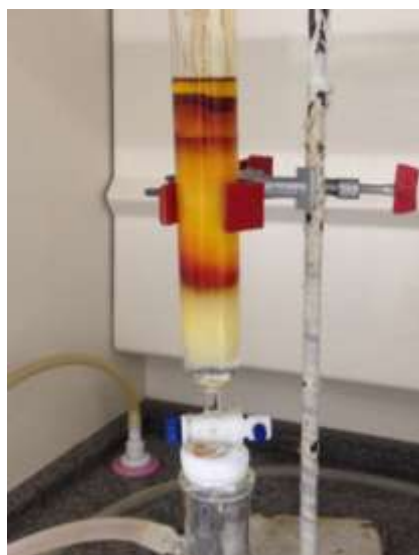
3.1 Separação e avaliação do padrão de norbixina

A Figura 2 apresenta separação e caracterização dos pigmentos extraídos por meio da eluição na cromatografia em coluna aberta (A) e o cromatograma em 3D (B) da norbixina, obtido no cromatógrafo de alta eficiência com detector de arranjo de diodo. É possível observar pelo cromatograma 3D que não há interferentes cromóforos nos comprimentos de ondas utilizados para a quantificação (453 nm e 482 nm).

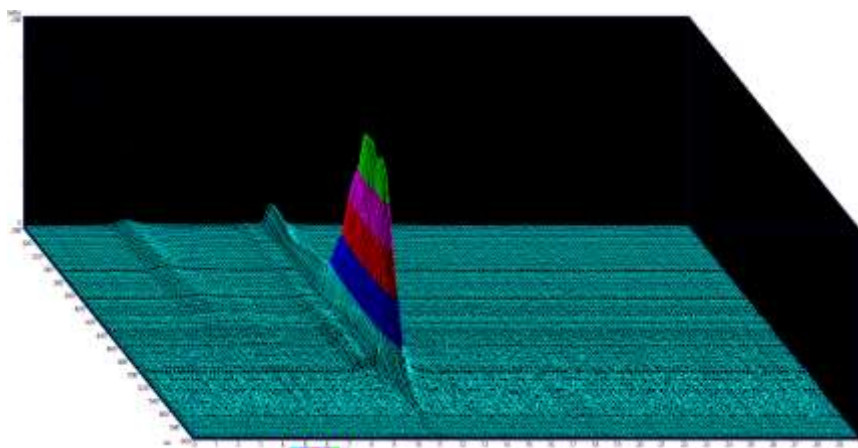
A Tabela 1 apresenta a concentração da norbixina separada utilizando os coeficientes de absorção indicado por Reith & Gielen (1971) ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2850$ a 453 nm) e pela FAO (2006) ($E_{1\text{cm}}^{1\%} =$



2870 a 482 nm). A média aritmética dessas concentrações foi utilizada para o estabelecimento dos coeficientes de absorção nesse trabalho.



A



B

Figura 2. Separação dos pigmentos extraídos de sementes de urucum por meio da eluição na cromatografia em coluna aberta (A) e cromatograma em 3D da norbixina (B). As condições cromatográficas estão apresentadas no texto.

Tabela 1. Concentração da norbixina utilizando os coeficientes de absorção indicado por Reith & Gielen (1971) ($E_{1cm}^{1\%} = 2850$ a 453 nm) e pela FAO (2006) ($E_{1cm}^{1\%} = 2870$ a 482 nm).

Leitura λ (nm)	$E_{1cm}^{1\%}$	Concentração (g/100g)	Média	s
453	2850	60,60	60,17	0,81
		59,23		
		60,67		
482	2870	60,18	59,75	0,81
		58,82		
		60,25		

3.2 Coeficiente de absorção para diferentes solventes

A Tabela 2 apresenta os coeficientes de absorção encontrados para os diversos solventes utilizados nesse estudo.



Tabela 2. Coeficientes de absorção encontrados nesse estudo.

Solvente	Comprimento de onda ($\lambda = \text{nm}$)	Coeficiente de absorção ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	s
KOH 0,5% (m/v)	453	2798	18
	482	2428	11
NaOH 0,5% (m/v)	454	2792	39
	483	2423	45
Acetona	456	2428	45
	486	2084	28
Metanol	450	2842	39
	477	2546	35
Clorofórmio (com adição de 1% ácido acético, m/v)	476	2614	48
	507	2271	41

s = estimativa de desvio padrão

A Norbixina é convertida a sal de norbixina quando solubilizada em solventes alcalinos, portanto, os coeficientes de absorção obtidos com esses solventes são referentes aos norbixatos de potássio (KOH) e norbixato de sódio (NaOH). Na literatura são encontrados valores para ambos os solventes. Reith e Gielen (1971), apresenta coeficientes de absorção de 2850 e 2550 para o sal de norbixina em NaOH 0,1N com leitura a 453 nm e 482 nm, respectivamente. Esses valores são superiores aos obtido nesse trabalho [$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2792 \pm 43$ ($\lambda = 454$ nm) e 2423 ± 38 ($\lambda = 483$ nm)].

Scotter et al (1994), Levy e Rivadeneira (2000) citam os valores de 2503 e 2870, respectivamente, como coeficiente de absorção do sal de norbixina em KOH 0,1N, a 482 nm. A FAO (2006) estabelece um valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2870$ para $\lambda = 482$ nm, para soluções em KOH 0,5% (m/v). Todos esses valores são superiores aos obtidos pelo nosso estudo ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2428 \pm 12$). Quando a absorção do sal de norbixina é medida no pico II ($\lambda = 453$ nm) para soluções em KOH 0,1N, Levy e Rivadeneira (2000) citam um valor igual a 3473. Esse valor é muito superior ao encontrado no nosso estudo ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2798 \pm 20$) para essas mesmas condições. O valor citado por Scotter et al (1994) ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2818$, $\lambda = 453$ nm, para soluções em KOH 0,1N) está próximo do coeficiente de absorção encontrado pelo nosso estudo ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2798 \pm 18$), considerando a margem de incerteza.

O coeficiente de absorção estabelecido por esse estudo para norbixina em clorofórmio e ácido acético, para comprimento de onda de 507 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2271 \pm 41$) é similar (dentro da margem de incerteza) ao $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ apresentado por Reith e Gielen (1971) ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2290 \pm 30$ a $\lambda = 503$ nm).



Reith e Gielen (1971) citam os seguintes valores de $E_{1cm}^{1\%}$ para soluções de norbixina em clorofórmio (sem a adição de ácido): 2470 ± 30 ($\lambda = 468$ nm) e 2200 ± 30 ($\lambda = 499$ nm).

Não foi encontrado na literatura valores de coeficientes de absorção para a norbixina nos solventes Metanol e Acetona. Barreth et al (2002) apresenta o coeficiente de absorção de 2931 a $\lambda = 488$ nm para a norbixina em metanol com adição de ácido acético.

3.3 Estudo de estabilidade da norbixina

A Tabela 3 e a Figura 3 apresentam os resultados das análises de norbixina nas três condições de armazenamento estabelecidas para esse estudo (-20°C , 10°C e 25°C). A análise de variância dos resultados indicou que houve diferença significativa ($p=5$) entre as três condições de armazenamento e que apenas o pigmento armazenado a -20°C não apresentou degradação significativa durante o período estudado (90 dias). São raros os artigos que avaliam a degradação térmica da norbixina, a maioria dos artigos usa a bixina como pigmento estudado. Silva (2006) estudou os parâmetros cinéticos da norbixina por termogravimetria e concluiu que o modelo de 1ª ordem foi o que melhor descreveu a reação de decomposição térmica da norbixina. Recentemente Gallardo-Cabrera & Rojas-Barahona (2015) estudaram a degradação de uma solução aquosa de norbixina (5.58% m/v) armazenada a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 12 meses. Segundo os autores houve uma degradação significativa da norbixina nesse período e seguiu um modelo linear.

Tabela 3. Resultados das análises de norbixina (g/100g) nas três condições de armazenamento estabelecidos para esse estudo (-20°C , 10°C e 25°C).

Temperatura	Período de armazenamento (dias)									
	0		15		30		60		90	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
-20°C	13,82	0,10	13,37	0,01	14,56	0,07	12,76	0,47	12,05	0,07
10°C	13,82	0,10	12,66	0,08	13,30	0,06	11,52	0,14	10,18	0,30
25°C	13,82	0,10	11,31	0,10	11,33	0,02	8,80	0,08	7,33	0,20

\bar{x} = média aritmética; s = estimativa de desvio padrão.

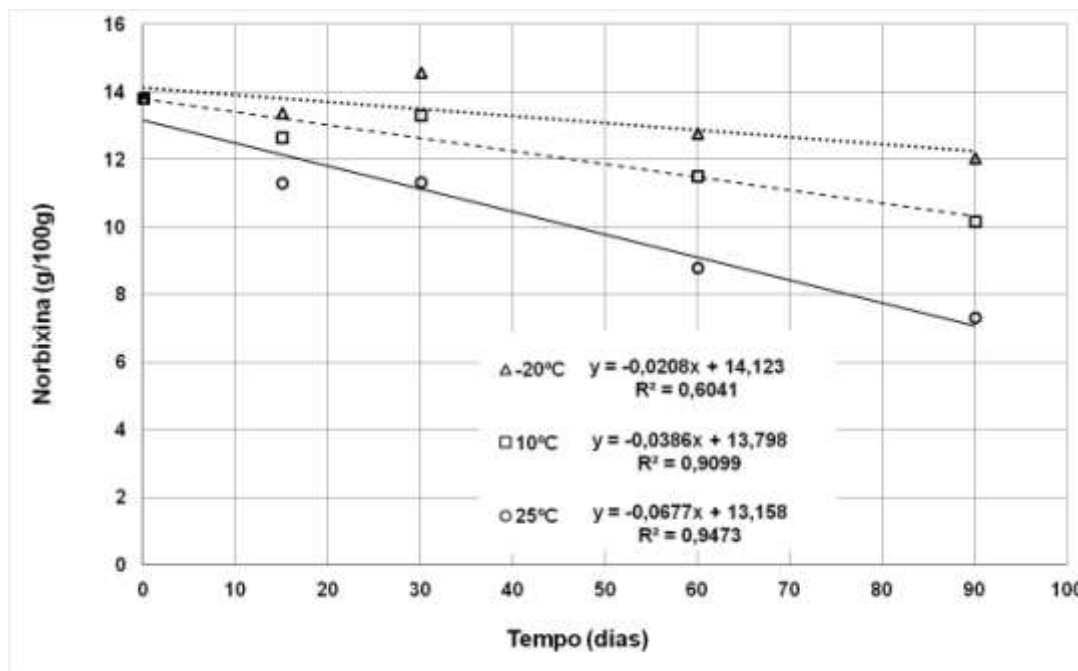


Figura 3. Gráfico dos resultados das análises das amostras de norbixina nas três condições de armazenamento estabelecidas para esse estudo (-20°C, 10°C e 25°C).

4 CONCLUSÃO

Os resultados de coeficientes de absorção apresentados nesse estudo não coincidem com vários valores apresentados na literatura, trazendo maiores dúvidas sobre o uso desses coeficientes. Sugere-se que esse estudo seja continuado buscando a separação de um padrão de norbixina com maior pureza, avaliada por métodos não espectrofotométricos, de modo a determinar com a robustez necessária os coeficientes de absorção para esse pigmento.

Não houve degradação significativa ($p \leq 0,05$) da norbixina armazenada à temperatura de -20°C, diferente da norbixina armazenada nas temperaturas de 10°C e 25°C, cuja degradação foi significativa ($p \leq 0,05$) e seguiu um modelo linear.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida à primeira autora.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. HPLC and espectrophotometric of annatto in cheese. **European Food Resources and Technology**, V.215, n.4, p.359-364, 2002.

CARVALHO, P.R.N.; HEIN, M. Urucum: Uma fonte de corante natural. **Coletânea do ITAL**, v.19, p.25-33, 1989.

FAO/WHO Compedium of Food Additives Specifications. **FAO Jecfa Monographs** n.3, 2006, 91p.

GALLARDO-CABRERA, C.; ROJAS-BARAHONA, A. Stability study and aqueous formulations of the Annatto dye. **Intern. Food Research Journal**, v. 22, n. 5. p. 2149-2154, 2015.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, 777 p.

LEVY, L.W.; RIVADENEIRA, D.M. Annatto. In: Natural food colorants science and technology. Chicago, DC: **IFT Basic Symposium Series**, p. 115-152, 2000

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and Chemistry on annatto. **Food Chemistry**, v. 5, p. 47-56, 1980.

REDDY, A.N.Y. Annatto del manufacture. **My Forest**, v.13, n.3, p.127-131, 1976.

REITH, J.F. & GIELEN, J.W. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. **Journal of Food Science**, v.36, n.6, p.861-864, 1971

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixinae das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em snacks extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, v. 3, n. 15, p. 203-213, 2004.

SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON L. A.; STRUTT, P.R. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**, v.11, n.3, p.301-315, 1994.

SILVA, G. S. Obtenção e avaliação dos parâmetros cinéticos do pigmento norbixina obtido das sementes de urucum (*Bixa orellana* L) por termogravimetria. Tese para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006, 86p.